WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

**PCT**

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : | | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40861 |
|---|---|---|
| A61L 2/02, A61K 35/14 | A1 | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. November 1997 (06.11.97) |

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT97/00075

(22) Internationales Anmeldedatum: 23. April 1997 (23.04.97)

(30) Prioritätsdaten:
A 780/96 30. April 1996 (30.04.96) AT

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BARRETT, Noel [IR/AT]; Steinwandgasse 6A, A-3400 Klosterneuburg/Weidling (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). PÖLSLER, Gerhard [AT/AT]; Simonsgasse 25/12, A-1220 Wien (AT). HÄMMERLE, Thomas [DE/AT]; Hofzeile 10-12/15/8, A-1190 Wien (AT).

(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, IL, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

**Veröffentlicht**
*Mit internationalem Recherchenbericht.*
*Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.*

(54) Title: BIOLOGICAL MATERIAL FREE OF VIRAL AND MOLECULAR PATHOGENS AND A PROCESS FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: BIOLOGISCHES MATERIAL FREI VON VIRALEN UND MOLEKULAREN PATHOGENEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG

(57) Abstract

The invention relates to biological material which is free of certain pathogens, in particular of viral pathogens. It also relates to a process for depleting a biological material of viral and molecular pathogens, at least one ligand or receptor which reacts with a receptor or ligand of the particular pathogen being added to said biological material thereby producing a ligand/receptor complex, and separation of the ligand/receptor complex by a process which separates the complexed pathogen partially or completely from biological material. The invention also relates to the use of said process to produce said biological material.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird ein biologisches Material, das frei von bestimmten Pathogenen, insbesondere von viralen Pathogenen ist, sowie ein Verfahren zur Abreicherung von viralen und molekularen Pathogenen aus einem biologischen Material, wobei ein biologisches Material mit mindestens einem Liganden oder Rezeptor, der mit einem Rezeptor oder Liganden des bestimmten Pathogens reagiert, versetzt wird, wodurch ein Ligand/Rezeptor-Komplex entsteht, und Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch ein Verfahren, das die teilweise oder vollständige Abtrennung des komplexierten Pathogens vom biologischen Material erlaubt, und die Verwendung des Verfahrens zur Herstellung eines biologischen Materials.

*LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | |
|---|---|
| AL | Albanien |
| AM | Armenien |
| AT | Österreich |
| AU | Australien |
| AZ | Aserbaidschan |
| BA | Bosnien-Herzegowina |
| BB | Barbados |
| BE | Belgien |
| BF | Burkina Faso |
| BG | Bulgarien |
| BJ | Benin |
| BR | Brasilien |
| BY | Belarus |
| CA | Kanada |
| CF | Zentralafrikanische Republik |
| CG | Kongo |
| CH | Schweiz |
| CI | Côte d'Ivoire |
| CM | Kamerun |
| CN | China |
| CU | Kuba |
| CZ | Tschechische Republik |
| DE | Deutschland |
| DK | Dänemark |
| EE | Estland |
| ES | Spanien |
| FI | Finnland |
| FR | Frankreich |
| GA | Gabun |
| GB | Vereinigtes Königreich |
| GE | Georgien |
| GH | Ghana |
| GN | Guinea |
| GR | Griechenland |
| HU | Ungarn |
| IE | Irland |
| IL | Israel |
| IS | Island |
| IT | Italien |
| JP | Japan |
| KE | Kenia |
| KG | Kirgisistan |
| KP | Demokratische Volksrepublik Korea |
| KR | Republik Korea |
| KZ | Kasachstan |
| LC | St. Lucia |
| LI | Liechtenstein |
| LK | Sri Lanka |
| LR | Liberia |
| LS | Lesotho |
| LT | Litauen |
| LU | Luxemburg |
| LV | Lettland |
| MC | Monaco |
| MD | Republik Moldau |
| MG | Madagaskar |
| MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| ML | Mali |
| MN | Mongolei |
| MR | Mauretanien |
| MW | Malawi |
| MX | Mexiko |
| NE | Niger |
| NL | Niederlande |
| NO | Norwegen |
| NZ | Neuseeland |
| PL | Polen |
| PT | Portugal |
| RO | Rumänien |
| RU | Russische Föderation |
| SD | Sudan |
| SE | Schweden |
| SG | Singapur |
| SI | Slowenien |
| SK | Slowakei |
| SN | Senegal |
| SZ | Swasiland |
| TD | Tschad |
| TG | Togo |
| TJ | Tadschikistan |
| TM | Turkmenistan |
| TR | Türkei |
| TT | Trinidad und Tobago |
| UA | Ukraine |
| UG | Uganda |
| US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| UZ | Usbekistan |
| VN | Vietnam |
| YU | Jugoslawien |
| ZW | Zimbabwe |

# Biologisches Material frei von viralen und molekularen Pathogenen und Verfahren zur Herstellung

Die Erfindung betrifft ein biologisches Material, das frei von bestimmten Pathogenen, insbesondere von viralen Pathogenen ist, sowie ein Verfahren zur Abreicherung von viralen und molekularen Pathogenen aus einem biologischen Material.

Die Herstellung von therapeutischen Proteinen und Präparationen durch Extraktion aus humanen oder tierischen Geweben oder Flüssigkeiten, wie Blut oder Plasma, sowie aus kontinuierlich wachsenden transformierten Säugerzellen ist häufig mit dem Risiko der potentiellen Kontamination durch Pathogene, wie Viren, virus-ähnliche Partikel oder Prionen behaftet. Es müssen daher Maßnahmen getroffen werden, daß möglicherweise vorhandene Pathogene nicht auf den Menschen übertragen werden.

Menschliches Blut bzw. Plasma z.B. kann Viren enthalten, die Krankheiten wie AIDS, Hepatitis B oder Hepatitis C verursachen. Bei Plasmaproteinen aus Plasmapools ist das Risiko, infektiöse Agenzien wie Viren zu übertragen, aufgrund der Selektion von Blut- oder Plasmaspenden und des Herstellungsverfahrens sehr gering. Geeignete Maßnahmen, wie den Ausschluß von Blutspendern, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, von der Blutspende sowie Analysen von Blut- oder Plasmaspenden, die es ermöglichen, infektiöse Spenden zu erfassen und von der weiteren Verteilung auszuscheiden, erlauben zwar die meisten infektiösen Spenden zu eliminieren, können aber zumeist nicht alle erfassen. Existierende Testsysteme zum Nachweis von infektiösen Viren in biologischen Materialien lassen Bedenken der potentiellen Übertragung der Pathogene nicht immer ausschließen, da es bei dem breiten Spektrum von infektiösen Pathogenen unmöglich ist, das Ausgangsmaterial auf alle Viren oder molekularen Pathogene, die in einer Probe vorhanden sein können, zu testen. Zudem erfassen die meisten Tests nicht das Virus, sondern gegen das Virus entwickelte Antikörper, so daß im Zeitraum des sogenannten "diagnostischen Fensters" kein Nachweis einer Kontamination erfolgen kann. Für einige Virusgruppen gibt es außerdem keine zuverläßige oder ge-

[illegible] Obwohl neuentwickelte Testver-

fahren, insbesondere Nukleinsäureamplifikationsverfahren, wie z.B. die PCR, sehr sensitiv und spezifisch sind, können sie nur auf Pathogene angewendet werden, deren Nukleinsäuresequenz bekannt ist. In Fällen, in denen zwar die Humanpathogene bekannt sind, jedoch keine sensitiven Verfahren zum Nachweis vorhanden sind, bleibt die Unsicherheit, daß ein negatives Resultat nur aufgrund eines zu geringen Virusgehalts, der unterhalb der Sensitivitätsgrenze des Testssytems liegt, erhalten wird.

Es wurden daher für die Herstellung von pharmazeutischen und therapeutischen Produkten spezifische Entfernungs- und/oder Inaktivierungsverfahren zur Abreicherung von Viren entwickelt, so daß im Endprodukt keine infektiösen Partikel mehr zu erwarten sind.

Verschiedene Inaktivierungsverfahren basieren auf einer physikalisch-chemischen Behandlung durch Hitze und/oder Chemikalien. Als Verfahren kommen insbesondere die thermische Behandlung, das Pasteurisieren, Behandeln der Proteinlösung mit ß-Propiolacton und UV-Licht, Behandeln mit einer Kombination eines Lösungsmittels und eines Detergens (sog. S/D-Verfahren) oder Belichten der Proteinlösung nach Zusatz einer photodynamischen Substanz zum Einsatz. Mit diesen Verfahren wurde eine Virusinaktivierung bis zu $10^6$ log-Stufen erreicht. Die Effizienz des Inaktivierungsverfahrens kann jedoch, abhängig vom Virustyp, variieren. Obwohl S/D-behandelte Blutprodukte als sicher in Bezug auf die Übertragung von HCV, HBV oder HIV gelten, werden nicht-umhüllte Viren, wie HAV oder Parvovirus, durch dieses Verfahren nicht inaktiviert (Prowse C. 1994. Vox Sang. 67:191-196).

Die Art des Inaktivierungsverfahrens kann auch einen Einfluß auf die Produkte haben und eine Stabilisierung zur Minimierung des Proteinverlustes ist daher oftmals notwendig. Zudem müssen einigen Inaktivierungsverfahren Reinigungsschritte folgen, um zugesetzte Chemikalien zu entfernen.

Verfahren zur Virusabreicherung umfassen insbesondere chromatographische Verfahren, Filtration von Proteinlösungen über einen [illegible] eine feste Phase und

anschließendes Entfernen der festen Phase, wie in der EP-0 679 405 beschrieben. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Behandlung mit einer festen Phase, wie z.B. mit Aerosil®, zwar eine Entfernung von HIV bis zu 4 log-Stufen aus einer Immunglobulin-haltigen Lösung erlaubt, der Verlust von IgG jedoch bis zu 42% betragen kann (Gao et al. 1993. Vox Sang 64:204-209). Für den großtechnischen Ansatz ist bei diesen hohen Verlustraten ein solches Verfahren daher eher ungeeignet.

Bei der Ultrafiltration erfolgt die Virusabreicherung durch einen auf dem Größenunterschied von Viruspartikeln basierenden Effekt. Von Bechtel et al. (1988. Biomat., Art. Cells, Art. Org. 16:123-128) wurde gezeigt, daß für Viren verschiedener Größe (EMC: 30-50 nm, Sindbis Virus: 50-70 nm und VSV 80-100 nm) in allen Fällen eine Virusabreicherung von 3,3-3,5 log-Stufen erreicht wird und die Abreicherung durch Ultrafiltration damit unabhängig von der Virusgröße und nicht genügend selektiv ist. Konventionelle Membranfilter haben aufgrund der Ausschlußgröße von ungefähr 0,1 µm- 0,2 µm den Nachteil, daß die meisten Viren den Filter frei passieren können. Die Entwicklung von Nanofiltern mit verschiedener nominaler Ausschlußgrößen von 15-75 nm oder 70-160 kD haben zur Möglichkeit geführt, Viren bis zu einer Größen von 28 nm zurückzuhalten (DiLeo et al. (1991). Nature 351:420-421, DiLeo et al. (1992). Bio/Technology 10:182-188, Burnouf-Radosevich et al. (1994). Vox Sang 67:132-138, Hamamoto et al. (1989). Vox Sang 56:230-236).

Die Verwendung von Nanofiltern zur Virusabreicherung erlaubt es, eine schonende Methode anzuwenden, bei der keine Veränderungen der Endprodukte auftreten und auch Viren kleiner Größen aus einem biologischen Material entfernt werden können. Hoffer et al. (1995. J. Chromatography B, 669:187-196) beschreiben ein Verfahren zur Virusabreicherung basierend auf Tangentialfluß-Filtration zur Herstellung eines Faktor IX-Konzentrates mit Viresolve®-Membranen der Ausschlußgröße von 70 kD und fanden einen Reduktionsfaktor von 3,5 log-Stufen für umhüllte Viren und von 7,2 log-Stufen für nicht-umhüllte Viren. Sie stellen jedoch fest, daß hochmolekulare Produkte von diesen Filtern zurückgehalten werden, wie Blutfaktoren mit geringem Molekulargewicht, wie

etwa Faktor IX oder Faktor XI können Nanofilter mit einer Ausschlußgröße zwischen 15 und 35 nm frei passieren (Burnouf-Radosevich et al. (1994). Vox Sang 67:132-138, Feldman et al. (1995). Acta Haematol. 94:25-34). Produkte mit größerem Molekulargewicht, wie etwa Faktor VIII (350 kD) vWF (bis zu 2,000 kD) oder Immunglobuline (IgG 150 kD) können nur Filter mit größerer Ausschlußgröße passieren. Dabei besteht jedoch die Gefahr, daß Viren mit kleinem Durchmesser nicht vom Filter zurückgehalten werden und ins Filtrat gelangen. Die Anwendung der Nanofiltration zur Herstellung virussicherer, therapeutisch anwendbarer Produkte, die insbesondere frei von kleinen Viren, wie HAV oder Parvovirus, sind, ist daher auf Produkte enthaltend Proteine mit geringer Molekülgröße, die auch einen Nanofilter mit kleiner Ausschlußgröße frei passieren können, beschränkt. Nur die Verwendung von Nanofiltern kleiner Ausschlußgröße von 15 nm sichert daher die Abreicherung und Entfernung von HAV und Parvovirus B19 aus biologischen Produkten. Es besteht jedoch der Nachteil, daß die Nanofiltration mit Filtern dieser Ausschlußgröße nicht für die Herstellung von Produkten enthaltend Proteine mit hohem Molekulargewicht anwendbar ist, da diese den Filter nicht passieren können und wie die Viren zurückgehalten werden.

Daß für verschiedene Viren beschriebene Durchmesser nicht immer absolut sind, stellt ein mögliches weiteres Problem bei der Nanofiltration dar. Die für HCV allgemein angegebene Größe beträgt 40-50nm (Murphy et al. (1995). Archives of Virology 10:424). Muchmore et al. ((1993). International. Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo) stellten jedoch fest, daß eine HCV-haltige Lösung, filtriert über einen 35 nm Nanofilter, zu einer HCV-Infektion bei Schimpansen führt. Die mögliche Variabilität der Größe verschiedener Viren beschränkt daher den Einsatz der Nanofiltration zur Virusabreicherung und zur Herstellung eines virussicheren Produktes bzw. birgt einen Unsicherheitsfaktor in sich.

Es besteht daher ein Bedarf nach industriell anwendbaren Methoden zur sicheren Abtrennung von Viren aus Proteinlösungen, um die Infektionsrisiken für Patienten zu vermindern, die mit pharmazeutischen tierischen, hu-

manen Ursprungs oder hergestellt über ein gentechnisches Verfahren aus Zellkulturen, behandelt werden.

Ebenso besteht Bedarf an virussicheren, pathogenfreien biologischen Produkten, bei denen durch das Herstellungsverfahren schon sichergestellt wird, daß kein Pathogen übertragen ist und das Verfahren schonend genug ist, damit die biologische Aktivität der Produkte weitgehend unbeeinträchtigt bleibt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein biologisches Material, das gegebenenfalls hochmolekulare pharmazeutisch relevante Proteine enthält, und frei von bestimmten viralen und molekularen Pathogenen ist, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen biologischen Materials, zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel ist, ein biologisches Material zu gewinnen, das sicher virusentfernt und frei von Zielviren ist, wobei ein Reduktionsfaktor von $>10^7$ erreicht wird - in Analogie zu bakteriendichten Filtern.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein biologisches Material, das sicher frei ist von bestimmten Pathogenen, zur Verfügung gestellt wird, das dadurch gewonnen wird, daß mindestens ein in einem biologischen Material enthaltener Ligand oder Rezeptor mit einem Rezeptor oder Liganden eines bestimmten Pathogens reagiert, versetzt wird, wodurch ein Ligand/Rezeptor-Komplex des komplexierten Pathogens entsteht. Der Ligand/Rezeptor-Komplex wird anschließend durch ein Verfahren, das die teilweise oder vollständige Abtrennung des komplexierten Pathogens erlaubt, aus dem biologischen Material entfernt.

Der Ligand oder Rezeptor, der mit dem Rezeptor oder Liganden des Pathogens reagiert, kann dabei bereits im Ausgangsmaterial enthalten sein. Vorzugsweise wird das biologische Material jedoch mit mindestens einem Liganden oder Rezeptor, der mit dem Rezeptor oder Liganden eines bestimmten Pathogens reagiert, versetzt. Dadurch ist eine gezielte Maßnahme zur optimalen Einstellung der Parameter, wie beispielsweise die Menge an Liganden oder Rezep-

[illegible] der Rezeptoren oder Mischungen

von verschiedenen Liganden oder Rezeptoren, oder gegebenenfalls auch eine Zugabe von weiteren Komponenten, die die Bildung des Komplexes unterstützen, möglich. Ebenso kann der Zeitpunkt zu dem eine Komplexierung erfolgen soll, gezielt bestimmt werden. So kann beispielsweise, falls mehrere Arbeitsgänge oder Reinigungsschritte vor der Pathogenabtrennung erfolgen, der Ligand oder Rezeptor erst vor dem finalen Schritt vor der Abtrennung, insbesondere vor dem Penetrieren des biologischen Materials durch einen durchlässigen Filter erfolgen. Der Ligand oder Rezeptor wird dem biologischen Material daher vorzugsweise kurz vor der Filtration zugegeben.

Der dem biologischen Material zugesetzte Ligand oder Rezeptor ist dabei eine an den Liganden oder Rezeptor und damit an eine spezifische Bindungsstelle des Pathogens bindungsfähige Komponente, die in der Lage ist, mit dem Pathogen einen Komplex, vorzugsweise einen hochmolekularen Komplex, zu bilden. Der Ligand oder Rezeptor des Pathogens kann dabei ein Antigen, ein Epitop oder eine antigene Determinante sein. Der reaktive, bindungsfähige Ligand oder Rezeptor, der dem biologischen Material zugesetzt wird, ist gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise ein spezifischer Antikörper, oder ein Fragment eines Antikörpers, das noch fähig ist, an den Liganden oder Rezeptor des Pathogens zu binden.

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße biologische Material dadurch gewonnen, daß als Ligand oder Rezeptor, der mit einem Ligand oder Rezeptor des Pathogens reagiert, ein Antikörper eingesetzt wird, und der Ligand oder Rezeptor des Pathogens ein Antigen ist, wodurch ein Antikörper/Antigen-Komplex als Ligand/-Rezeptor-Komplex entsteht. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird der Komplex anschließend aus dem biologischen Material entfernt.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung wird das von bestimmten Pathogenen freie biologische Material dadurch gewonnen, daß der Liganden/Rezeptor-Komplex, vorzugsweise der Antikörper/-Antigen-Komplex, vom biologischen Material durch Penetrieren der Lösung durch einen durchlässigen Filter abgetrennt wird. Die Ab- [illegible] auch durch Sedimenta-

tion, vorzugsweise durch Dichte-Gradientenzentrifugation erfolgen.

Dem biologischen Material, das unter Verdacht steht, gegebenenfalls ein infektiöses Pathogen zu enthalten, werden dabei gemäß der vorliegenden Erfindung Antikörper oder noch bindungsfähige Teile eines Antikörpers gegen mindestens ein infektiöses Agens zugesetzt. Es können jedoch auch Antikorper gegen mehrere bekannte infektiöse Viren, wie z.B. HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV, HIV, CMV oder Parvovirus, oder gegen molekulare Pathogene, wie z.B. Prionen, zugesetzt werden. Die Zugabe der Antikörper kann derart erfolgen, daß eine Immunglobulin-haltige Lösung zu einer Protein-haltigen Lösung zugesetzt wird, wobei die Immunglobuline auch im Überschuß zugesetzt werden können (und damit in einer neutralisierenden Konzentration), so daß das Risiko, daß noch potentielle Pathogene in freier Form im biologischen Material vorliegen, ausgeschlossen werden kann. Es wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß auch die Zugabe von nicht-neutralisierenden Konzentrationen von Antiserum eine komplette und vollständige Abreicherung von Pathogenen aus einem biologischen Material erlaubt.

Vorzugsweise wird daher der Ligand oder Rezeptor, insbesondere ein Antikörper in einer nicht-neutralisierenden Konzentration zugesetzt, wobei die Konzentration jedoch ausreichend ist, um die vorhandenen Pathogene zu komplexieren, so daß sie durch den Abtrennungsschritt vollständig vom biologischen Material entfernt werden können.

In manchen Fällen kann es vorkommen, daß Aggregate unterschiedlicher Größe entstehen können, wobei auch kleine Aggregate entstehen können, die noch in der Lage sind, das Filter frei zu passieren bzw. deren Sedimentationsdichte nicht ausreichend ist, um sie vom biologischen Material abzutrennen.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird daher zur Verbesserung der Abtrennung des Ligand/Rezeptor-Komplexes die Aggregation des Komplexes erhöht, indem neben Immunglobulin-haltigen

[illegible] Material

zugesetzt werden, die entweder freie Pathogene weiter agglutinieren oder die Komplexierung des Liganden/Rezeptor-Komplexes erhöhen. Dies kann durch die Zugabe von Agglutininen, wie Lektine, einer oder mehrerer Komplement-Komponenten, Conglutinin, Rheumafaktor, einem nicht-toxischen, wasserlöslichen, synthetischen Polymer, insbesondere von Polyethylenglykol oder Albumin (mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %) oder anderen aus dem Stand der Technik bekannten Agglutinationsmitteln erfolgen. Die Zugabe des Aggregationsmittels erfolgt dabei derart, daß vorzugsweise Antigen/Antikörper-Komplexe bis zu einer im Lichtmikroskop sichtbaren Größe entstehen.

Das erfindungsgemäße biologische Material ist besonders dadurch gekennzeichnet, daß es sicher frei von bestimmten viralen Pathogenen, sowohl aus der Gruppe der Lipid-umhüllten als auch der nicht-umhüllten Viren ist. Dazu zählen insbesondere Viren wie HAV, HBV, HCV, HGV, HIV, HEV, HDV, CMV oder Parvovirus. Da der als Ligand oder Rezeptor vorzugsweise eingesetzte spezifische Antikörper die entsprechenden Antigene an der Oberfläche des jeweiligen Virus erkennt und an ihn bindet, kann jedes Virus, für das Antikörper zu Verfügung stehen oder gegen das spezifische Antikörper hergestellt bzw. in einer Immunglobulin-Lösung enthalten oder aus ihr isoliert werden können, komplexiert werden und der Komplex gemäß der Erfindung aus dem biologischen Material entfernt werden. Dadurch ist es möglich, bekannte, aber auch noch nicht identifizierte Viren, gegen die Immunglobulinhaltige Lösungen zur Verfügung stehen, zu komplexieren, gegebenenfalls komplett zu neutralisieren, und den Antikörper/Antigen-Komplex aus dem biologischen Material abzutrennen und so sicher pathogenfreies biologisches Material zu gewinnen.

Besondere Aufmerksamkeit wurde in den letzten Jahren auch der Übertragung von potentiell infektiösen molekularen Pathogenen, wie etwa Prionen, geschenkt. Derzeit stehen nur wenige, effektive Verfahren zur Reduktion von Verursachern der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder der BSE zur Verfügung. Pocchiari et al. (1991. Horm. Res. 35:161-166) schlugen eine Kombination von Ultrafiltration und 6 M Harnstoff zur Abreicherung von sog. [illegible] inwieweit

die biologische Aktivität eines so behandelten Proteins in Mitleidenschaft gezogen wird. Durch die Behandlung mit hohen Konzentrationen des Protein-denaturierenden Harnstoffes, ist jedoch davon auszugehen, daß Proteine in einer so behandelten Lösung zumindestens teilweise denaturiert und damit inaktiviert werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt ist das erfindungsgemäße biologische Material daher auch frei von molekularen Pathogenen, insbesondere von Prionen, wie den Erregern der BSE oder der Creuzfeldt-Jakob-Krankheit. Gegen diese Pathogene können gezielt Antikörper hergestellt werden oder Immunglobulin-haltige Lösungen bereitgestellt werden, die insbesondere anti-ß-Amyloid-Antikörper enthalten. Durch Zusatz von anti-ß-Amyloid-haltigen Immunglobulinlösungen zu einem biologischen Material können daher auch potentielle molekulare Erreger in einem Komplex gebunden und der Komplex aus dem biologischen Material entfernt werden.

Da die Abtrennung des Liganden/Rezeptor-Komplexes und damit des komplexierten Pathogens unabhängig von den physiko-chemischen Eigenschaften eines Virus ist, wird ein virussicheres, pathogenfreies biologisches Material gewonnen, dessen physiko-chemische Eigenschaften durch das Abreicherungsverfahren nicht beeinflußt werden. Bekanntermaßen hat bei konventionellen Inaktivierungsverfahren die Zugabe von Chemikalien oder die thermische Behandlung, falls nicht geeignete Maßnahmen wie etwa die Zugabe von Stabilisatoren vorgenommen werden, einen Einfluß auf die Produkte selbst. Eine Abreicherung der Pathogene durch Komplexierung mit einem Liganden oder Rezeptor und Abtrennung des Komplexes aus einem biologischen Material ohne physikalisch-chemische Behandlung bietet daher den großen Vorteil, daß die Pathogene effizient eliminiert werden, das Produkt jedoch in seiner nativen Form unbeeinträchtigt bleibt. Ein so erhaltenes biologisches Material enthält damit Proteine, die in ihren Eigenschaften denen der nativen Proteine im Ausgangsmaterial vor dem Abreicherungsschritt entsprechen und unveränderte Aktivität aufweisen. Auch wird vermieden, daß, wie etwa bei einigen Virusinaktivierungsverfahren, gegebenenfalls denaturierte Proteine entstehen, die in zusätzliche Reinigungsschritten aus der Proteinlösung

Nach der Abreicherung der Pathogene aus dem biologischen Material kann das erhaltene pathogenfreie Material natürlich weiteren Reinigungsschritten unterzogen werden, um eventuell nicht im Endprodukt erwünschte Begleitproteine zu entfernen. Dazu können alle im Stand der Technik bekannten Verfahren, wie Chromatographie, insbesondere Ionenaustauschchromatographie oder Affinitätschromatographie, oder Gelfiltration durchgeführt werden.

Die Abtrennung von Begleitproteinen aus dem erfindungsgemäßen biologischen Material, wie etwa die Abtrennung von Blutfaktoren aus einer für die Herstellung einer Immunglobulin-haltigen Präparation vorgesehenen Fraktion, kann auch vor der Virusabreicherung erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Abreicherung der Pathogene aus dem biologischen Material jedoch vor der chromatographischen Abtrennung von Begleitproteinen, da durch das chromatographische Verfahren neben dem Reinigungseffekt auch eine zusätzliche Abreicherung des komplexierten Pathogens sowie eventuell noch vorhandener Liganden oder Rezeptoren, die ursprünglich dem biologischen Material zugesetzt wurden, erreicht werden kann.

Das erfindungsgemäß erhaltene biologische Material ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß es sicher frei ist von bestimmten viralen und molekularen Pathogenen, wobei die Pathogene im wesentlichen vollständig aus dem biologischen Material entfernt sind. "Vollständig" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß durch das Verfahren im biologischen Material eine Abreicherung von Pathogenen mit einem Reduktionsfaktor von mindestens 7 log-Stufen erreicht wird - in Analogie zu bakteriendichten Filtern. Vorzugsweise erfolgt die Abtrennung mit einer Kapazität von >7 log-Stufen, vorzugsweise >9 log-Stufen, und besonders bevorzugt >10 log-Stufen. Gemäß den Richtlinien der United States Pharmacopeia (1995, USP 23, NF 18: 1978-1980) wird die Rückhaltekapazität eines Filters durch den log-Reduktionswert (RF) beschrieben. Beispielsweise ist die Rückhaltekapazität eines 0,2 µm-Sterilfilters, der $10^7$-Mikroorganismen zurückhalten kann, mindestens 7 log-Stufen. Diese Größe gilt dabei als vollständige Abtrennung der Viren durch das Filter.

Da eine Antikörper-haltige Hyperimmunglobulinlösung dem biologischen Material gegebenenfalls im Überschuß zugesetzt wird, um alle freien, infektiösen Pathogene zu komplexieren, enthält das erfindungsgemäße biologische Material gegebenenfalls auch nicht-komplexierte, in freier Form vorliegende Antikörper. Nach der Abtrennung des Antikörper/Antigenkomplexes aus dem biologischen Material, entweder durch Filtration oder Sedimentation, enthält das pathogenfreie biologische Material daher gegebenenfalls auch anti-HAV-, anti-HCV-, anti-HBV oder anti-Parvovirus spezifische Antikörper.

Da durch einen Überschuß an Liganden oder Rezeptoren, die das biologische Material enthält bzw. zugesetzt werden, und die an das Pathogen binden und komplexieren, keine freien Viren mehr im biologischen Material vorliegen und die Abtrennung des komplexierten Pathogens entweder durch Filtration oder Sedimentation erfolgt, gelangen weder in freier Form vorliegende Pathogene noch mit dem Liganden/Rezeptor komplexierte Pathogene ins Filtrat. Das so erhaltene Filtrat enthaltend biologisch aktive Proteine ist daher gemäß der vorliegenden Erfindung nicht nur frei von nicht-komplexiert und frei vorliegenden Pathogenen, sondern auch frei von in einem Komplex mit einem Liganden, wie etwa einem Antikörper, vorliegenden Pathogenen.

Ein gemäß der vorliegenden Erfindung erhältliches pathogenfreies biologisches Material kann eine Plasmafraktion, eine Immunglobulin-haltige Plasmafraktion, eine Plasmaprotein-haltige Fraktion enthaltend Blutfaktoren wie etwa Faktor II, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein C, Protein S, vWF, ein Konzentrat enthaltend einen der genannten Blutfaktoren, ein Überstand einer Hybridoma-Zellinie, ein Zellkulturüberstand von transformierten oder infizierten Säugerzellen oder ein Extrakt eines tierischen oder humanen Gewebes sein.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Abreicherung von viralen und molekularen Pathogenen aus einem biologischen Material sowie ein Verfahren zur Gewinnung von biologischem Material, das sicher frei von viralen

fahren ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein in einem biologischen Material (mit Verdacht auf Anwesenheit eines bestimmten Pathogens) enthaltener Rezeptor oder Ligand, mit einem Rezeptor oder Liganden eines Pathogens reagiert, wodurch gegebenenfalls ein Ligand/Rezeptor-Komplex eines komplexierten Pathogens entsteht. Vorzugsweise wird dem biologischen Material ein Ligand oder Rezeptor, der mit dem Rezeptor oder Liganden des Pathogens reagiert, zugesetzt. Der gegebenenfalls gebildete Ligand/Rezeptor-Komplex wird anschließend durch ein Verfahren, das die teilweise oder vollständige Abtrennung des komplexierten Pathogens erlaubt, aus dem biologischen Material entfernt. Durch die Komplexierung eines freien Pathogens mit einem Liganden in einem Komplex wird ein komplexiertes Pathogenpartikel erhalten, das vergrößert ist, eine höhere Dichte oder einen höheren Sedimentationskoeffizienten aufweist als das freie Pathogen.

Auch weist der Komplex eine höhere Aggregierung auf als das freie Pathogen, wodurch aufgrund der erhöhten Aggregierung der Durchmesser des komplexierten Pathogens vergrößert wird und seine Durchläßigkeit durch bestimmte Membranfilter verändert wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Abreicherung von Pathogenen und Gewinnung eines pathogenfreien biologischen Materials erfolgt daher durch Komplexierung des Pathogens mit einem Liganden/Rezeptor zur Erhöhung seiner Dichte oder Sedimentationseigenschaften sowie der Vergrößerung des Durchmessers durch Erhöhung der Aggregation. Das komplexierte Pathogen kann anschließend aufgrund derart veränderter Eigenschaften aus dem biologischen Material abgetrennt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens erfolgt das Abtrennen des Liganden/Rezeptor-Pathogen-Komplexes durch Penetrieren eines durchlässigen Filters, wobei der Komplex selektiv vom Filter zurückgehalten wird. Die Ausschlußgröße des Filters ist gemäß der vorliegenden Erfindung dabei so gewählt, daß auch hochmolekulare Proteine, wie etwa Faktor VIII, vWF oder Immunglobuline den Filter frei passieren können und auch bei

stopfung der Filterporen zu erwarten ist. Die Filterausschlußgröße darf natürlich nicht die höchstmögliche Aggregationsgröße des Liganden/Rezeptor-Komplexes und insbesondere des Antikörper/Antigen(Pathogen)-Komplexes übersteigen, da ansonsten auch hochmolekulare, dichte Pathogen/Antikörper-Komplexe den Filter passieren und so ins Filtrat gelangen.

Zur Durchführung des vorliegenden Verfahrens sind daher Nanofilter geeignet. Besonders bevorzugt sind dabei Nanofilter mit einer nominellen Ausschlußgröße zwischen 35-100 nm. Diese Ausschlußgröße erlaubt es, daß hochmolekulare Proteine den Filter frei passieren können; jedoch halten sie auch freie, nicht-komplexierte Pathogene mit einem Durchmesser >100nm sowie Komplexe von Pathogenen dieser Größe zurück. Zudem wird bei der Verwendung von Filtern mittlerer Ausschlußgröße vermieden, daß die Filter durch höhermolekulare Proteine oder andere Bestandteile, die im biologischen Material vorhanden sein können, verstopft werden können und ihre Durchflußkapazität sinkt. Auch ist beim Einsatz der Tangentialfluß-Filtration gegebenenfalls ein geringerer Druck notwendig, um die Flüssigkeit über den Filter zu schicken, wodurch auch die Gefahr sinkt, daß durch den angelegten Druck der Filter in Mitleidenschaft gezogen wird und Risse erhält. Die Verwendung von Nanofilter mit einer Ausschlußgröße ≥35 nm zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bietet daher neben der für das Endprodukt effizienten und schonenden Abreicherung von Pathogenen den Vorteil, daß die Kosten für die verwendeten Filter geringer sind als bei Nanofilter kleiner Ausschlußgröße. Dies macht das Verfahren insbesondere für den großtechnischen Asatz interessant.

Es ist natürlich auch möglich, Filter mit einer Ausschlußgröße >100nm zur Durchführung des Verfahrens einzusetzen, wobei jedoch vorher sichergestellt werden muß, daß sehr große Pathogen-Liganden-Komlexe bzw. Antikörper/Antigen-Aggregate gebildet werden, oder daß gegebenenfalls zusätzliche Agglutinationsmittel eingesetzt werden, damit der Ligand/Rezeptor-Komplex ausreichend groß ist, damit er den Filter nicht frei passieren kann. Die Bedingungen können dabei natürlich auch so gewählt werden, daß Anti-

stehen, die sogar durch einen konventionellen Sterilfilter zurückgehalten werden. Grundsätzlich gilt, daß je kleiner die Ausschlußgröße eines Filters um so kostspieliger ist seine Herstellung.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß auch Filter mit einer nominalen Ausschlußgröße von 0,04 µm bis zu 3 µm eine vollständige Abtrennung von gemäß dem vorliegenden Verfahren komplexierten Pathogenen aus einem biologischen Material erlauben. Damit wurde gezeigt, daß gemäß der vorliegenden Erfindung Ligand/Rezeptor-Komplexe gebildet werden, die eine Größe im sichtbaren Bereich (etwa im Lichtmikroskop) erreichen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform erfolgt das Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch Sedimentation. Bevorzugt ist dabei die Sedimentation durch Dichte-Gradientenzentrifugation.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ist der zum biologischen Material zugesetzte Ligand oder Rezeptor eine an den Liganden oder Rezeptor und damit an eine spezifische Bindungsstelle des Pathogens bindungsfähige Komponente, die in der Lage ist, mit dem Pathogen einem Komplex, vorzugsweise einen hochmolekularen Komplex, zu bilden. Der Ligand oder Rezeptor des Pathogens kann dabei ein Antigen, ein Epitop oder eine antigene Determinante sein. Der reaktive, bindungsfähige Ligand oder Rezeptor, der dem biologischen Material zugesetzt wird und mit dem Liganden oder Rezeptor des Pathogens reagiert, ist vorzugsweise ein Antikörper oder ein bindungsfähiges Fragment eines Antikörpers. Der Antikörper kann dabei ein Antikörper aller Subklassen sein, wobei jedoch die Subklassen IgG und IgM besonders bevorzugt sind. Es kommen jedoch als Liganden oder Rezeptoren alle bekannten Komponenten in Betracht, die in der Lage sind, an einen Rezeptor oder Liganden eines Pathogens zu binden und mit dem Pathogen einen hochmolekularen Komplex zu bilden.

Durch die Zugabe eines an einen in einem biologischen Material möglicherweise vorkommenden Pathogen bindungsfähigen Rezeptors oder Liganden wird ein hochmolekularer Komplex aus Pathogen und

[illegible] erhalten.

Gemäß einem Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird einem biologischen Material, vorzugsweise einer Protein-haltigen Lösung, eine Immunglobulin-haltige Lösung enthaltend spezifische Antikörper, gerichtet gegen infektiöse Humanpathogene, zugesetzt, wodurch zwischen den möglicherweise im biologischen Material vorhandenen Pathogenen und den Antikörpern ein Antikörper/-Antigen-Komplex entsteht.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Aggregation des Liganden/Rezeptor-Pathogen-Komplexes noch weiter erhöht, wodurch Komplexe mit einer höheren Dichte und einem größeren Durchmesser entstehen. Dies erfolgt erfindungsgemäß durch die Zugabe von weiteren Agglutinationsmitteln, insbesondere von Lektinen, wie etwa Concanavalin A, Ricin oder Phasin, oder ein oder mehrere Komplement-Komponenten, Conglutinin, Rheumafaktor oder einem synthetischen Polymer, wie beispielsweise Polyethylenglykol oder von Albumin. Das Aggregationsmittel kann entweder gleichzeitig mit dem Liganden oder Rezeptor, der mit dem Pathogen reagiert, zum biologischen Material oder nach einer vorgegebenen Zeitspanne nach dessen Zugabe zugesetzt werden. Bevorzugt ist jedoch, daß das Agglutinationsmittel nach einer zeitlichen Verzögerung nach Zugabe der Immunglobulin-Lösung erfolgt. Dadurch wird gewährleistet, daß die Agglutinine oder Conglutinine nicht mit den Antikörpern reagieren und diese aggregieren oder komplexieren, sondern erst schon gebildete Pathogen/Antikörper-Komplexe zu höhermolekularen Komplexen aggregieren. Dadurch wird ebenfalls gewährleistet, daß durch die weitere Aggregation eine höhere Komplexdichte erreicht wird, wodurch der Komplex mit verbesserter Effizienz aus dem biologischen Material entfernt werden kann. Durch die höhere Komplexierung der Antigen/Antikörper-Aggregate ist es möglich, bei der Abtrennung der Membranfilter, auch Filter mit einer größeren Ausschlußgröße von vorzugsweise ≥35 nm einzusetzen. Auch ist durch die höhere Dichte der aggregierten Partikel eine verbesserte Abtrennung durch Sedimentation möglich, da dadurch alle komplexierten Pathogene erfaßt werden können.

Durch die Zugabe von Immunglobulin-haltigen Lösungen oder Ligan-

ren, ist es ebenfalls möglich, sowohl virale als auch molekulare Pathogene, unabhängig von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, aus einem biologischen Material abzureichern. Dies gilt insbesondere für Viren oder molekulare Pathogene, die mit konventionellen Verfahren bisher nicht abreicherbar oder inaktivierbar waren. So werden von dem erfindungsgemäßen Verfahren auch kleine nicht-Lipid-umhüllte Viren, wie Parvovirus oder HAV, erfaßt, die bisher weder durch physikalisch-chemische Inaktivierungsverfahren, wie die S/D-Behandlung, noch durch die Nanofiltration effizient aus hochkonzentrierten Proteinlösungen oder aus Lösungen enthaltend hochmolekulare Proteine (>150 kD) entfernt oder inaktiviert werden konnten. Das Verfahren ist daher für die Abreicherung aller viralen und molekularen Pathogene, mit denen ein biologisches Material kontaminiert sein kann, anwendbar, insbesondere für die Abreicherung Lipid-umhüllter oder nicht-Lipid-umhüllter Viren, wie HAV, HBV, HCV, HIV, HEV, HDV, HGV, CMV oder Parvovirus aber auch für Prionen. Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Abreicherung von Pathogenen in einem biologischen Material und Gewinnen von biologischem Material, das hochmolekulare Proteine, etwa Immunglobuline oder vWF, enthält.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird daher auch eine pathogenfreie, virussichere Plasmaprotein-haltige Zusammensetzung, bei der die Plasmaproteine mindestens 80 % der Aktivität im Ausgangsmaterial aufweisen, bereitgestellt, wobei die Zusammensetzung durch das erfindungsgemäße Verfahren gewonnen wird.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung wird bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens als Ligand ein Antikörper, erhalten aus einer Hyperimmunglobulin-Lösung oder einem Überstand einer Hybridoma-Zellinie, eingesetzt. Die Immunglobulin-haltige Lösung kann dabei von Plasmaspenden erhalten werden, die einen hohen Titer an Antikörper, gerichtet gegen ein bestimmtes Pathogen, enthalten. Dies sind insbesondere Immunglobulin-Lösungen von Spendern enthaltend anti-HCV-, anti-HAV-, anti-HBV-, anti-HIV-, anti-HEV-, anti-HDV, anti-HGV-, anti-CMV- oder anti-Parvovirus-Antikörper. Die Antikörper-haltige Lösung kann [illegible] wie die Hybridoma-Tech-

nik hergestellt werden. Dabei werden monoklonale Antikörper, gerichtet gegen ein Antigen eines bestimmten Pathogens von einer Hybridoma-Zellinie, in den Überstand des Kulturmediums sekretiert, aus dem dann die Antikörper in einer hochtitrigen Lösung isoliert werden können.

Aus Plasmaspenden gewonnene Immunglobulin-haltige-Lösungen können gegebenenfalls auch freie Viren, gegen die die in der Lösung enthaltenen Antikörper gerichtet sind, sowie andere Pathogene erhalten. Dies gilt im gleichen Maß auch für über Hybridoma-Technik hergestellte monoklonale Antikörper, bei denen eine mögliche Kontamination mit viralen Pathogenen nicht auszuschließen ist. Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zur Durchführung des Verfahrens eingesetzte Hyperimmunglobulinlösung gegebenenfalls einem Virusinaktivierungs- und/oder Virusabreicherungsverfahren unterzogen.

Falls der Antikörper in der Immunglobulin-haltigen Lösung mit einem niedrigen Titer vorliegt, kann der Antikörper gegebenenfalls angereichert und anschließend in einer hochkonzentrierten Lösung als Ligand oder Rezeptor eingesetzt werden.

Gemäß einem besonderen Aspekt wird zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens als Antikörper ein anti-ß-Amyloid-Antikörper eingesetzt. Anti-ß-Amyloid-Antikörper erkennen vorzugsweise Strukturen an der Oberfläche von Prionen, können an diese binden und einen Prionen/Antikörper-Komplex bilden. Gemäß der vorliegenden Erfindung können gegen Prionen, insbesondere gegen den Erreger der Creuzfeldt-Jakob-Krankheit, gezielt Antikörper hergestellt oder anti-ß-Amyloid-haltige Immunglobulin-Lösungen bereitgestellt werden und einem biologischen Material, das gegebenenfalls Prionen enthält, zugesetzt werden. Durch die Anlagerung von anti-ß-Amyloid-Antikörpern an die Prionen werden die niedermolekularen Prionen zu einem hochmolekularen Komplex aggregiert, der anschließend selektiv aus dem biologischen Material durch Filtration oder Sedimentation abgetrennt werden kann.

Gemäß einem weiteren besonderen Aspekt der Erfindung werden als [illegible] gerichtet gegen HAV, HBV,

HCV, HIV, HGV, HEV oder Parvovirus, eingesetzt. Zur Durchführung des Verfahrens kann eine Immunglobulin-haltige Lösung enthaltend gegen ein bestimmtes Virus gerichtete Antikörper zum biologischen Material gegeben werden. Es kann jedoch auch eine Mischung von Antikörpern oder anderen Liganden zugesetzt werden, die gegen verschiedene Pathogene, mit denen das biologische Material möglicherweise kontaminiert sein kann, gerichtet sind. Nach der Zugabe mindestens einer gegen ein bestimmtes Pathogen gerichteten Immunglobulin-haltigen Lösung oder einer Mischung aus gegen verschiedene Pathogene gerichteten Antikörper-haltigen Lösungen, wird die Mischung aus biologischem Material und Immunglobulin-Lösung über einen Zeitraum, der es erlaubt, einen Komplex zwischen dem Antigen des Pathogens und dem Antikörper zu bilden, inkubiert und der gebildete Komplex anschließend aus dem biologischen Material, wie oben beschrieben, abgetrennt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Abreicherung von viralen und/oder molekularen Pathogenen in einem biologischen Material eingesetzt werden. Das biologische Material kann eine Plasmafraktion, eine Immunglobulin-haltige Plasmafraktion, eine Plasmaprotein-haltige Fraktion enthaltend Blutfaktoren wie etwa Faktor II, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein C, Protein S, vWF, ein Konzentrat enthaltend einen der genannten Blutfaktoren, ein Überstand einer Hybridoma-Zelllinie, ein Zellkulturüberstand von transformierten oder infizierten Säugerzellen oder ein Extrakt eines tierischen oder humanen Gewebes sein. Die Parameter zur Durchführung des Verfahrens werden dabei jeweils abgestimmt auf die Art und Beschaffenheit des biologischen Materials und der möglicherweise vorhandenen kontaminierenden Pathogene. So wird die Bildung des Liganden/Rezeptor-Komplexes zur Aggregierung des Pathogens unter Bedingungen durchgeführt, die eine optimale Komplexierung, insbesondere der Bindung zwischen Rezeptor und Liganden bzw. zwischen Antikörper und Antigen des Pathogens, erlauben. Die optimalen Parameter, wie etwa pH, Temperatur, Zeitdauer der Inkubation zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, in Abhängigkeit von der Art des Pathogens, der Spezifität des zugesetzten Liganden oder Rezeptors (Antikörper) und der Beschaffenheit des bio- Proteinkonzentration

in der Lösung), können von jedem Fachmann aufgrund seines allgemeinen Wissens ermittelt werden. Falls der Ligand/Rezeptor-Komplex aus dem biologischen Material durch einen Filtrationsschritt entfernt wird, wird ein Filter mit einer Ausschlußgröße verwendet, der es ermöglicht, daß das biologische Material den durchlässigen Filter frei passiert und der Ligand/Rezeptor-Komplex vom Filter selektiv zurückgehalten wird.

Um sicher zu gehen, daß alle freien Pathogene im biologischen Material durch Antikörper komplexiert wurden, wird sowohl das Filtrat als auch das Konzentrat auf die Anwesenheit von Viren oder einem Überschuß an spezifischen Antikörpern getestet. Die Abreicherungsrate der Pathogene aus dem biologischen Material kann dabei über Methoden der Virustiterbestimmung oder über die Ermittlung der Genkopienzahl bzw. Genomäquivalente bestimmter Viren, z.B. durch quantitative PCR, wie von Dorner et al. (1994. 25. Hämophilie-Symposion. ed. Scharrer & Schramm S. 29-44) beschrieben, im Filtrat und Konzentrat erfolgen.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird das durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltene biologische Material auf die Anwesenheit (eines Überschusses) des eingesetzten Liganden/Rezeptors, insbesondere eines spezifischen Antikörpers, getestet. Da bei Zugabe eines Überschusses eines gegen ein bestimmtes Pathogen gerichteten Antikörpers, nicht-gebundene und nicht-komplexierte Antikörper eine Dichte und molekulare Größe aufweisen, die unterhalb der des komplexierten Antikörpers liegt, ist das Vorhandensein von freien Antikörpern im biologischen Material ebenfalls ein Kriterium für die zur Komplexierung des freies Pathogens ausreichende Konzentration an Antikörpern in der Lösung. Die Anwesenheit eines Überschusses an eingesetzem Liganden oder Rezeptor wird dabei derart bestimmt, daß einer Probe des biologischen Materials vor und nach der Pathogenabreicherung eine bekannte Menge eines viralen oder molekularen Pathogens, der spezifische Liganden oder Rezeptoren für den Antikörper besitzt, zugesetzt wird, das so gewonnene biologische Material enthaltend den Antikörper/Pathogen-Komplex erneut über einen durchlässigen Filter gefiltert wird und die Restmenge an [illegible] dadurch kann ermittelt wer-

den, ob die für die Abreicherung eingesetzte Immunglobulin-Lösung einen für die Komplexierung der Pathogene ausreichenden Antikörpergehalt aufweist, und ob nicht-komplexierte Antikörper im Filtrat und damit im Endprodukt vorliegen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Abreicherung von viralen und molekularen Pathogenen und Gewinnung von pathogenfreiem biologischen Material kann mit jedem bekannten Virusinaktivierungsverfahren, wie z.B. der Behandlung mit Hitze, Pasteurisieren oder dem S/D-Verfahren kombiniert werden. Vorzugsweise werden die Inaktivierungsverfahren vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angewendet, da so durch das Inaktivierungsverfahren nicht erfaßte Viren durch das erfindungsgemäße Verfahren abgereichert werden können.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung eine virusinaktivierte Immunglobulin-Lösung enthaltend spezifische Antikörper gegen virale oder molekulare Pathogene zur Verwendung als Ligand zur Komplexierung von viralen oder molekularen Pathogenen im erfindungsgemäßen Verfahren zur Verfügung.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Abreicherung von viralen und/oder molekularen Pathogenen kann insbesondere zur Gewinnung und Herstellung eines biologischen Materials, das frei ist von bestimmten sowohl in freier, nicht-komplexierter als auch in gebundener, komplexierter und aggregierter Form vorliegenden Pathogenen, verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf die Beispiele eingeschränkt ist.

Beispiel 1: (nach Ansicht der Anmelderin derzeit die beste Form der Durchführung der Erfindung)

**Abreicherung von HAV durch HAV-spezifische Antikörper und anschließende Nanofiltration**

98 ml einer 2%igen humanen Serumalbumin-Lösung, die frei von [illegible] Lösung, die

Hepatitis A Virus (HAV)-spezifische Antikörper enthielt, wurden mit hochtitrigem HAV beaufschlagt. Aus Aliquoten beider Lösungen wurde der Virustiter bestimmt. Die Lösungen wurden anschließend einer 4-stündigen Tangentialfluß-Filtration mit einem Eingangsdruck von 0,8 bar unterworfen. Es wurde ein 0,001 $m^2$/35 nm-Filter (Planova 35N, Asahi) verwendet. Die HAV-Titration erfolgte wie bei Barrett et al. (J. Med. Virol. (1996), Vol. 49: 1-6).

Der Virustiter wurde nach erfolgter serieller ½ log-Verdünnung in Zellkulturmedium bestimmt. Jeweils hundert µl jeder seriellen Verdünnung wurden in 8 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben, die 1 x $10^4$ FRhK-4-Zellen pro Vertiefung enthielten. Die Platten wurden anschließend 14 Tage bei 37°C inkubiert. Nach sieben Tagen erfolgte ein Medienwechsel. Nach dieser Inkubationszeit wurde der zellschädigende Effekt (cytopathic effect, cpe) mikroskopisch bestimmt. Die $TCID_{50}$ wurde auf der Basis der Anzahl der Vertiefungen der Mikrotiterplatte, die einen positiven CPE zeigten, ermittelt. Die Effizienz des Prozesses der Virusabreicherung wurde als Reduktionsfaktor (R.F.) ausgedrückt, der nach der vom E.C. Committe for Proprietary Medicine (Commission of the European Communities (1991): Ad hoc Working Party on Biotechnology / Pharmacology - Note for Guidance (Validation of Virus Removal and Inactivation Procedures) III/8115/89-EN) empfohlenen Formel berechnet wurde:

$$10^{R.F.} = \frac{\text{Probenvolumen vor Behandlung x Virustiter vor Behandlung}}{\text{Probenvolumen nach Behandlung x Virustiter nach Behandlung}}$$

Wie aufgrund der Virusgröße (Durchmesser 25-30 nm) zu erwarten war, wurde HAV in Abwesenheit eines HAV-spezifischen Antikörpers durch Filtration über die 35 nm-Membran nicht zurückgehalten. Aus dem Ansatz, der Immunglobulin mit HAV-spezifischen Antikörpern enthielt, konnte hingegen eine vollständige Virusentfernung durch die Filtration durch die 35 nm Membran erreicht werden (R.F. > 5,2), wobei kein Virus im Filtrat nachgewiesen werden konnte und der Virus zu 100% im Konzentrat zurückgehalten wurde (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Einfluß spezifischer Antikörper auf die Abreicherung von Hepatitis A-Virus durch 35nm-Nanofiltration

| | Humanes Serum-Albumin | Immunoglobulin |
|---|---|---|
| Virus-Stock-Titer | $10^{7.9}$ | $10^{7.9}$ |
| Virus-Titer im Produkt | $10^{6.3}$ | $10^{5.3}$ |
| Virus-Titer im Konzentrat | $10^{5.7}$ | $10^{5.9}$ |
| Virus-Titer im Filtrat | $10^{5.7}$ | $<10^{0.1}$ |
| Reduktionsfaktor | 0.6 | >5.2 |

**Beispiel 2:**
**Abreicherung von Parvoviren durch anti-Parvovirus-spezifische Antikörper und anschließende Nanofiltration**

Es wurde untersucht, ob ein Kaninchen-Antiserum gegen den Parvovirus "minute mouse virus" (MMV, ATCC VR1346) durch Bildung eines Komplexes mit dem Virus in der Lage ist, den Virus bei der Filtration über eine 35 nm-Membran zurückzuhalten.

Das Kaninchenantiserum wurde durch Immunisierung der Tiere mit konzentrierten, Formalin-inaktivierten MMV-Präparationen und komplettem Freund'schen Adjuvans und einem anschließenden Booster mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans, der 4 Wochen nach der Primärimmunisierung durchgeführt wurde, erhalten. Die Blutgewinnung zur Serumherstellung erfolgte 4 Wochen nach der

98 ml einer 2%igen humanen Immunglobulin-Lösung wurde mit 2 ml einer MMV-Suspension beaufschlagt. Nach Zugabe von 0, 0,005, 0,05, 0,5, 5,0 ml des anti-MMV Serums wurde jede Mischung einer Filtration, unter Bedingungen wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen.

Proben von Virus-beaufschlagtem Ausgangsmaterial, Konzentrat (verdünnt zum Originalvolumen) und Filtrat wurden nach dem Standard $TCID_{50}$-Test wie in Beispiel 1 beschrieben titriert, mit dem Unterschied, daß A9-Zellen (ATCC CRL6319) für die Virusvermehrung verwendet wurden und eine Inkubationszeit von 7 Tagen gewählt wurde.

Wie aufgrund der Virusgröße (Durchmesser 18-24 nm) zu erwarten war, wurde MMV ohne Zugabe des Antiserums durch die 35 nm-Filtermembran nicht zurückgehalten, sondern wurde zu 100% im Filtrat wiedergefunden (R.F.: -0,1). Nach Zugabe von 5 ml MMV-spezifischem Antiserum konnte die Virus-Infektiösität vollständig neutralisiert werden, so daß das Virus weder im Filtrat noch im Konzentrat nachgewiesen werden konnte. Aber auch bei Zugabe von nicht-neutralisierenden Konzentrationen des Antiserums (0,5 ml) wurde eine vollständige Entfernung des Virus durch die Filtration erreicht (R.F. >6,9), wobei kein Virus im Filtrat nachweisbar war. Noch niedrigere Konzentrationen des MMV-spezifischen Antiserums (0,05 ml) führten ebenfalls zu einer weitgehenden Entfernung des MMV durch die Filtration (R.F.: 4,4) (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Einfluß spezifischer Antikörper auf die Abreicherung von Parvovirus durch 35nm-Nanofiltration

| IgG | 98 ml | 98 ml | 98 ml | 98 ml | 98 ml |
|---|---|---|---|---|---|
| MMV | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Anti-MMV-Serum aus Kaninchen | 0 ml | 0.005 ml | 0.05 ml | 0.5 ml | 5 ml |
| Virus-Stock-Titer | $10^{8.2}$ | $10^{7.6}$ | $10^{7.6}$ | $10^{8.1}$ | $10^{7.5}$ |
| Virus-Titer im Produkt | $10^{6.0}$ | $10^{5.9}$ | $10^{5.3}$ | $10^{7.0}$ | $10^{5.5}$ |
| Virus-Titer im Konzentrat | $10^{6.4}$ | $10^{5.8}$ | $10^{4.6}$ | $10^{3.8}$ | $<10^{0.1}$ |
| Virus-Titer im Filtrat | $10^{6.1}$ | $10^{4.6}$ | $10^{0.9}$ | $<10^{0.1}$ | $<10^{0.1}$ |
| Reduktionsfaktor | -0.1 | 1.3 | 4.4 | >6.9 | >5.4 |

**Beispiel 3:**
**Abreicherung von HCV durch anti-HCV-Antikörper und anschließende Nanofiltration**

Die Möglichkeit, die Viruspassage des Hepatitis C-Virus (HCV) durch eine 35 nm-Filtermembran durch Zugabe eines HCV-spezifischen Antikörpers zur Virussuspension zu verhindern, wurde untersucht. Ein anti-HCV-Antikörper-freies Plasma, das mit HCV hochkontaminiert war, diente als Ausgangsmaterial für den hochtitrigen Virus-Stock. Etwa 250 ml Plasma wurden in einer Beckmann-Zentrifuge (Rotor JA10) 20 min bei 10 000 rpm geklärt. Der Überstand wurde einer 2,5 stündigen Ultrazentrifugation bei 55 000 rpm in einem Ti 70-Rotor unterzogen. Nachdem das Pellet [illegible] resuspendiert und gepoolt wurde (ca. 10 ml) wurde die [illegible] wie von

Dorner et al. ((1994), 25. Hämophilie-Symposium, ed. Scharrer & Schramm, S. 29-44) beschrieben, bestimmt.

95 ml einer 2%igen humanen Immunglobulin-Lösung wurden mit 2,5 ml des konzentrierten Virus-Stocks beaufschlagt. 5 ml einer 10%-igen humanen Immunglobulinlösung, die Antikörper gegen HCV aber keine HCV-Genom-Äquivalente enthielt (was durch quantitative PCR sichergestellt wurde) oder 5 ml PBS als Kontrolle wurden zugegeben. Beide Ansätze wurden einer Tangentialfluß-Filtration, unter Bedingungen wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen. In Proben des HCV-beaufschlagten Ausgangsmaterials, des Filtrates und des Konzentrates, das auf das ursprüngliche Volumen verdünnt wurde, wurden die HCV-Genkopienzahlen, wie oben beschrieben, ermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß nach Zugabe von anti-HCV-spezifischem Immunglobulin durch Filtration über eine 35 nm-Membran eine vollkommene Virusentfernung aus dem Filtrat erreicht wurde (R.F.: >3,0), während im Kontrollansatz keine wesentliche Abreicherung des HCV erzielt werden konnte (R.F.: 1,4) (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Einfluß eines spezifischen Antikörpers auf die Abreicherung des Hepatitis C Virus durch 35nm Nanofiltration

| IgG | 95 ml | 95 ml |
|---|---|---|
| HCV | 2.5 ml | 2.5 ml |
| Anti-HCV IgG | 0 | 5 ml |
| Virus-Stock-Titer (Genom-Kopien/ml) | $10^7$ | $10^7$ |
| Virus-Titer im Produkt (Genom-Kopien/ml) | $10^{5.7}$ | $10^{5.7}$ |
| Virus-Titer im Konzentrat (Genom-Kopien/ml) | $10^{5.3}$ | $10^{5.7}$ |
| Virus-Titer im Filtrat (Genom-Kopien/ml) | $10^{4.3}$ | $<10^{2.7}$ |
| Reduktionsfaktor | 1.4 | >3.0 |

**B e i s p i e l 4 :**

**Abreicherung von HAV durch Immunglobulin-Lösungen mit unterschiedlichem anti-HAV-Antikörpertiter**

Eine Reihe von verschiedenen Immunglobulin-haltigen Lösungen (Lots) mit HAV-Antikörpertitern zwischen 1,5 Units/ml bis 11 Units/ml und als Kontrolle eine HSA-Lösung, die keine HAV-spezifischen Antikörper enthielt, wurden mit hochtitrigem HAV beaufschlagt. Die Lösungen wurden anschließend, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit einem Gesamtvolumen von 250 ml einer Tangentialfluß-Filtration unterzogen und der Virustiter im Konzentrat und Filtrat bestimmt. Die Ergebnisse der HAV-Abreicherung sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Abreicherung von Hepatitis A-Virus (HAV) durch 35 N-Nanofiltration

| Lot | P061960A1 | P061960A1 | P065960A1 | Human Serum Albumin |
|---|---|---|---|---|
| HAV spezifischer Antikörpertiter(Units/ml) | 1,5 | 1,5 | 11 | negative |
| | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) |
| Virus Stock (VS) | $10^{8.3}$ | $10^{7.6}$ | $10^{7.6}$ | $10^{8.0}$ |
| Virus-Stock verdünnt 1:40 im Produkt | $10^{5.8}$ | $10^{6.1}$ | $10^{6.4}$ | $10^{6.7}$ |
| Konzentrat | $10^{5.6}$ | $10^{6.0}$ | $10^{6.3}$ | $10^{5.7}$ |
| Filtrat | $\leq 10^{0.1}$ | $\leq 10^{0.1}$ | $\leq 10^{0.1}$ | $10^{5.4}$ |
| **Reduktionsfaktor*** | **>5,7** | **>6,0** | **>6,3** | **1,3** |

* Der Reduktionsfaktor wurde entsprechend den CPMP-Richtlinien (CPMP/BWP/268/95) bestimmt.

Auch bei Immunglobulin-Lösungen mit geringerem HAV-Antikörpertiter ist ein Reduktionsfaktor von > 6 log-Stufen möglich. Mit einer Lösung, die einen etwa 10-fach höheren Antikörpertiter aufweist, kann keine Verbesserung der Virusabreicherung erreicht werden. Daraus ergibt sich, daß unabhängig vom spezifischen Bereiches

eine reproduzierbare Abreicherung von HAV möglich ist.

**B e i s p i e l 5:**
**Virusabreicherungskapazität einer HAV-Antikörper-haltigen Lösung**

Um die Abreicherungskapazität der Antikörper-haltigen Lösung zu testen, wurde das gemäß Beispiel 4 erhaltene Filtrat erneut mit HAV beaufschlagt und die Virusabreicherungskapazität der im Filtrat noch vorhandenen Antikörper bzw. der Reduktionsfaktor bestimmt.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der HAV-Abreicherung in einem erneut beaufschlagten Filtrat aus einer niedrig- und hochtitrigen Immunglobulin-Lösung zusammengefaßt.

**Tabelle 5:** Abreicherung von Hepatitis A-Virus (HAV) durch 35 N-Nanofiltration nach Re-Spiken mit HAV

| Lot | P061960A1 | P061960A1 | P065960A1 |
|---|---|---|---|
| HAV spezifischer Antikörpertiter(Units/ml) | 1.5 | 1.5 | 11 |
| | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) | Virustiter ($TCID_{50}$/ml) |
| Virus-Stock (VS) | $10^{6.0}$ | $10^{7.6}$ | $10^{7.6}$ |
| VS verdünnt 1:40 im kombinierten Filtrat | $10^{5.2}$ | $10^{5.4}$ | $10^{5.4}$ |
| Konzentrat | $10^{5.6}$ | $10^{5.6}$ | $10^{5.0}$ |
| Filtrat | $\leq 10^{0.1}$ | $\leq 10^{0.1}$ | $\leq 10^{0.1}$ |
| **Reduktionsfaktor*** | **> 5.1** | **>5.3** | **>5.3** |

* Der Reduktionsfaktor wurde entsprechend den CPMP-Richtlinien (CPMP/BWP/268/95) bestimmt.

Es zeigt sich, daß auch bei einem Immunglobulin-haltigen Ausgangsmaterial mit geringem Antikörpertiter (1,5 U/ml) noch genügend Antikörper vorhanden ist und eine Abreicherung von nochmals mehr als 5 log-Stufen möglich ist. Die Virusabreicherungskapazi-

wesentlich erhöht.

Summiert man die Abreicherungsraten der 1. und 2. Virusbeaufschlagung, so kann eine Virusabreicherung mit einem Gesamt-Reduktionsfaktor von mindestens 11 log-Stufen erreicht werden.

**B e i s p i e l 6 :**
**Abreicherung von Parvovirus mittels Anti-Parvovirus-Antikörper-haltigen Immunglobulin-Lösung**

Eine Reihe von Immunglobulin-Präparationen (Lots) wurden auf Parvovirus B19-spezifische Antikörper getestet. In den verschiedenen Lots wurde mittels ELISA ein Antikörpertiter zwischen 1:400 bis 1:800 gefunden.

Zwei verschiedene Lots mit einem geringen B19-spezifischen Antikörpertiter von 1:400 wurden mit einem hochtitrigen Virusstock von Parvovirus B19 beaufschlagt und aus beiden Lösungen mittels quantitativer PCR der Titer bestimmt. Die Bestimmung mittels quantitativer PCR erfolgte gemäß der in der EP-0 714 988 beschriebenen Methode mit dem Parvovirus-spezifischen Primerpaar:

Parvo + 1353/FAM : 5' GGGGCAGCATGTGTTAAAGTGG 3' bp 1353-1374*
Parvo-1529 : 5' CCTGCTACATCATTAAATGGAAAG 3' bp 1529-1506*

* Nummerierung gemäß der Mastersequenz PARPVBAU (EMBL-Datenbank)

Als Verifier wurde Plasmid pParvo-wt, enthaltend die Parvovirus-spezifischen Sequenzen von nt 1127-1550 (gemäß der Nummerierung von Shade et al. (1986), J. Virol. 58:921) verwendet. Als interne Standards wurden Plasmid pParvo-15 und Plasmid pParvo+21 eingesetzt. pParvo-15 wurde durch Deletion eines 35 bp-Fragments zwischen nt 1455-1489 und Inserierung eines ds-Oligonukleotids generiert aus den Primern 5' GTT CCA GTA TAT GGC ATG GTT 3' und 5' ACC CAT GCC ATA TAC TGG AAC 3' hergestellt. pParvo+21 wurde durch Duplikation der bp 1468-1487 zwischen nt 1453 und 1454 erhalten. Die PCR-Produkte wiesen nach Amplifikation mit den Parvospezifischen Primern eine entsprechende Länge von 177 bp

Jede der Mischungen wurde einer Filtration, unter Bedingungen wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen. In Proben des Virus-beaufschlagten Ausgangsmaterials, des Konzentrats (verdünnt zum Originalvolumen) und des Filtrats wurde mittels einem quantitativen Nukleinsäureamplifikationsverfahren (PCR) der Titer bestimmt. Die Ergebnisse der Titerbestimmung sid in Tabelle 6 zusammenfaßt. Es wurde eine hervorragende Abreicherung von etwa 6 log-Stufen erreicht.

**Tabelle 6:** Abreicherung von B19-Parvovirus durch 35 N-Nano-filtration

| Lot | P061960A1 | P065960A1 |
|---|---|---|
| B19 spezifischer Antikörpertiter (Units/ml) | 1:400 | 1:400 |
| | Titer (Genom-Kopien/ml) | Titer (Genom-Kopien/ml) |
| Virus-Stock (VS) | $10^{11.6}$ | $10^{11.0}$ |
| VS verdünnt 1:40 im Produkt | $10^{8.8}$ | $10^{8.6}$ |
| Konzentrat | $10^{8.9}$ | $10^{8.5}$ |
| Filtrat | $<10^{2.7}$ | $<10^{2.7}$ |
| **Reduktionsfaktor*** | **>6.1** | **>5.9** |

* Der Reduktionsfaktor wurde entsprechend den CPMP-Richtlinien (CPMP/BWP/268/95) bestimmt.

**B e i s p i e l 7 :**
**Virusabreicherungskapazität der anti-Parvovirus B19-Antikörper-haltigen Lösung**

Um die Abreicherungskapazität der Antikörper-haltigen Lösung zu testen, wurde das gemäß Beispiel 6 erhaltene Filtrat erneut mit Parvovirus beaufschlagt und die Virusabreicherungskapazität der im Filtrat noch vorhandenen Antikörper bzw. der Reduktionsfaktor bestimmt.

einem erneut beaufschlagten Filtrat einer Immunglobulin-haltigen Lösung mit einem 1:400-Antikörpertiter zusammengefaßt.

**Tabelle 7:** Abreicherung von B19-Parvovirus durch 35 N-Nanofiltration und Re-Spiken mit Parvovirus

| Lot | P061960A1 | P065960A1 |
|---|---|---|
| B19 spezifischer Antikörpertiter (Units/ml) | 1:400 | 1:400 |
| | Titer (Genom-Kopien/ml) | Titer (Genom-Kopien/ml) |
| VS verdünnt 1:40 im kombinierten Produkt | $10^{8.2}$ | $10^{8.4}$ |
| Konzentrat | $10^{10}$ | $10^{10.1}$ |
| Filtrat | $10^{3.2}$ | $10^{3.4}$ |
| **Reduktionsfaktor*** | **5.0** | **5.0** |

* Der Reduktionsfaktor wurde entsprechend den CPMP-Richtlinien (CPMP/BWP/268/95) bestimmt.

Es zeigt sich, daß im Filtrat noch genügend Antikörper vorhanden waren, um eine weitere Abreicherung um 5 log-Stufen zu erreichen. Summiert man die Abreicherungsrate und den Reduktionsfaktor nach der 1. und 2. Beaufschlagung, so wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Reduktionsfaktor von mindestens 11 log-Stufen erreicht, was einer vollständigen Entfernung der Pathogenen aus dem biologischen Material entspricht.

Daraus kann abgeleitet werden, daß das System für die industrielle Anwendung geeignet ist und sichert, daß Protein-haltige Lösungen frei von infektiösen Pathogenen erhalten werden können.

**B e i s p i e l 8 :**
**Abreicherung von Parvovirus mit Filtern mit verschiedenen Ausschlußgrößen**

Beispiel 1 konnte gezeigt werden, daß schon durch Zugabe

anschließender Nanofiltration über eine 35 nm-Membran eine vollständige Entfernung von Pathogen erreicht wird. Um zu testen, ob auch Filter mit einer höheren Ausschlußgröße für die Abreicherung der Antigen-Antikörper-Komplexe geeignet sind, wurden eine Reihe von Tiefenfiltern mit einer nominalen Ausschlußgröße zwischen 0,04 µm und 3 µm, auf ihre Fähigkeit, Parvovirus MMV "minute mouse virus" zurückzuhalten, getestet. 196 ml einer 2%igen IgG-Lösung wurden mit 4 ml einer MM-Virustiterpräparation beaufschlagt und anschließend mit 1 ml Kaninchen-anti-MMV-Serum versetzt. Als Kontrolle wurde eine beaufschlagte Gammaglobulin-Lösung ohne spezifisches anti-MMV-Serum eingesetzt. Die Mischungen wurden über verschiedene Tiefenfilter mit einer nominalen Ausschlußgröße von 3 µm, 0,5 µm, 0,3 µm und 0,04 µm mit einer Durchflußrate von 50 ml/min bis zum Endpunkt filtriert. Der Virustiter wurde sowohl im Ausgangsmaterial als auch im Filtrat bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

elle 8: Abreicherung von Parvovirus MMV durch konventionelle Tiefenfiltration von Gammaglobulin

| | Nominale Filterausschlußgröße | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3µ | 3µ | 0.5µ | 0.5µ | 0.3µ | 0.3µ | 0.04µ | 0.04µ |
| aninchen anti-MMV erum | = | ± | = | ± | = | ± | = | ± |
| rus-Stock-Titer | $10^{8.7}$ | $10^{8.3}$ | $10^{8.7}$ | $10^{8.0}$ | $10^{8.3}$ | $10^{8.7}$ | $10^{8.3}$ | $10^{8.1}$ |
| irustiter im Produkt | $10^{7.1}$ | $10^{5.5}$ | $10^{7.6}$ | $10^{5.4}$ | $10^{7.0}$ | $10^{5.3}$ | $10^{7.0}$ | $10^{5.2}$ |
| Virustiter im Filtrat | $10^{5.3}$ | $\leq 10^{0.1}$ | $10^{5.7}$ | $\leq 10^{0.1}$ | $10^{5.3}$ | $\leq 10^{0.1}$ | $10^{3.7}$ | $10^{0.1}$ |
| Reduktionsfaktor | 0.8 | > 5.4 | 1.9 | > 5.3 | 1.7 | > 5.2 | 3.3 | > 5.1 |

Es zeigte sich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren noch mit Filtern mit einer Ausschlußgröße von 3 µm eine Abreicherung um mehr als 5 log-Stufen möglich ist, während ohne Zugabe eines Liganden, der die Pathogene komplexiert, nur mit einem Filter mit etwa 0,4 µm ein signifikanter Reduktionsfaktor erreicht wurde.

**Beispiel 9 :**
**Effekt von Rheumafaktor auf die Abreicherung von Poliovirus**

Um den Einfluß der Zugabe von Agglutininen, die die Größe des Komplexes erhöhen können, auf die Effizienz der Abreicherung zu testen, wurde Rheumafaktor als Agglutinin bzw. Conglutinin der beaufschlagten Immunglobulin-Lösung zugesetzt. 85 ml einer 2%igen Immunglobulin-Lösung wurden mit 5 ml einer hochtitrigen Poliovirus Typ 1-haltigen Präparation beaufschlagt. 10 ml einer Präparation, enthaltend humanen Rheumafaktor mit einem Titer von 800 U/ml, wurden zu der Mischung gegeben. Als Kontrolle wurden anstatt des Rheumafaktors 10 ml Puffer zugesetzt. Beide Mischungen wurden über eine 35 N-Membran, wie in Beispiel 1 beschrieben, filtriert und der Virustiter im Konzentrat und Filtrat bestimmt. Die Virustiterbestimmung erfolgte durch eine $TCID_{50}$-Bestimmung auf VERO-Zellen.

Die Resultate der Bestimmung sowie der ermittelte Reduktionsfaktor mit und ohne Zugabe von Rheumafaktor sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9:** Effekt von Rheumafaktor auf die Abreicherung von Poliovirus aus einer Immunglobulin-Lösung und Nanofiltration

| | | |
|---|---|---|
| IgG Volumen (ml) | 85 | 85 |
| Rheumafaktor (ml) | = | 10 |
| Puffer (ml | 10 | = |
| Polio Virus(ml) | 5 | 5 |
| Virusstocktiter | $10^{10.1}$ | $10^{10.4}$ |
| Virusstock-Titer im Produkt | $10^{8.3}$ | $10^{8.2}$ |
| Virustiter im Konzentrat | $10^{9.0}$ | $10^{9.3}$ |
| Virustiter im Filtrat | $10^{5.2}$ | $<10^{0.6}$ |
| Reduktionsfaktor | 3.1 | >7.6 |

Die Resultate zeigen, daß Rheumafaktor in Kombination mit dem spezifischen anti-Poliovirus-Antikörper das Virus so komplexiert, daß es effektiv durch Nanfiltration über einen 35 N-Filter zurückgehalten werden kann. Wird kein weiteres Agglutinationsmittel (Rheumafaktor) zugesetzt, so wird eine Virusabreicherung mit einem Reduktionsfaktor von 3,1 log-Stufen erreicht, der durch die Anwesenheit des Rheumafaktors auf einen Reduktionsfaktor von >7,6 erhöht werden kann. Damit ist erstmals eine effektive und im wesentlichen vollständige Abtrennung von kleinen, nicht-umhüllten Viren aus einer Proteinlösung möglich.

**Beispiel 10 :**
**Effekt von Agglutininen bzw. Conglutininen auf die Abreicherung von Poliovirus mittels konventioneller Tiefenfiltration**

Die Fähigkeit von Rheumafaktor, die Abreicherung von hochtitrigem Poliovirus bei Verwendung von konventionellen Tiefenfiltern zu beeinflussen, wurde bestimmt. Dabei wurde ein Filtertyp verwendet, der sich als ineffektiv bei der Abreicherung von Polio- [illegible] in Gegenwart von Poliovirus-spezifischen Antikör-

bulin-Lösung mit 5 ml einer hochtitrigen Poliovirus-Stocklösung beaufschlagt und 10 ml einer Lösung von Rheumafaktor mit einem Titer von 800 Units/ml zugegeben. Als Kontrolle wurden anstatt Rheumafaktor 10 ml Puffer zugesetzt. Beide Mischungen wurden durch einen Seitz BKS-P-Tiefenfilter mit einer Durchflußrate von 50 ml/min filtriert. Der Virustiter wurde im Ausgangsmaterial vor und nach der Filtration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß nur durch die Zugabe eines weiteren Aggregationsmittels, wie etwa Rheumafaktor, Poliovirus bei Verwendung eines konventionellen Tiefenfilters effizient abgereichert werden konnte. Dieses Verfahren resultiert in einer Abreicherung mit einem Reduktionsfaktor von > 7,7 log-Stufen, während ohne Zugabe von Rheumafaktor lediglich eine Reduktion von etwa 1,1 log-Stufen erreicht wurde. Dies zeigt deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren bei Zugabe von Lektinen oder Lektin-ähnlichen Proteinen, wie Conglutinine - auch bei Verwendung von konventionellen Tiefenfiltern - eine im wesentlichen vollständige Abtrennung der Pathogene erzielt wird.

**Tabelle 10:** Effekt von Rheumafaktor auf die Abreicherung von Poliovirus aus einer Gamma-Globulinlösung durch konventionelle Tiefenfiltration

| IgG Vol (ml) | 85 | 85 |
|---|---|---|
| Rheumafaktor | - | 10 |
| Puffer (ml) | 10 | - |
| Poliovirus (ml) | 5 | 5 |
| Virus-Stock Titer | $10^{10.6}$ | $10^{10.5}$ |
| Virustiter im Produkt | $10^{8.0}$ | $10^{8.3}$ |
| Virustiter im Filtrat | $10^{6.9}$ | $< 10^{0.6}$ |
| Reduktionsfaktor | 1.1 | > 7.7 |

**Beispiel 11 :**
**Bestimmung der Aktivität von Faktor VIII und vWF vor und nach Virusabreicherung**

Die Aktivität zweier Plasmafaktor wurde vor und nach Virusabreicherung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt. Dazu wurden 100 ml einer Faktor VIII/vWF-Komplex-haltigen Lösung durch ein Cuomo ZA 90-Tiefenfilter mit einer Durchflußrate von 50 ml/min gefiltert. In Proben des Ausgangsmaterials und des Filtrats wurden die Faktor VIII-Aktivität und der vWF-Antigengehalt bestimmt und eine vWF-Multimeranalyse durchgeführt. In einem Parallelexperiment wurde das gleiche Material mit Parvovirus "mouse minute virus" (MMV) beaufschlagt und spezifisches anti-MMV-Antiserum vor der Filtration zugesetzt. Der Virustiter wurde vor und nach Filtration im Ausgangsmaterial und im Filtrat bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammenfaßt und zeigen, daß unter diesen Bedingungen eine Abreicherung um > 6,5 log-Stufen erreicht wird. Die Faktor VIII-Aktivität bzw. der vWF-Antigengehalt bleiben durch das Verfahren im wesentlichen unbeeinflußt. Ebenso konnte gezeigt werden, daß das vWF-Multimer-Pattern im wesentlichen unverändert erhalten bleibt (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 11:** Bestimmung der Faktor VIII- und vWF-Aktivität vor und nach Filtration

| | FVIII-Aktivität (I.E./ml) | vWF-Antigen (µg/ml | log 10 MMV-Titer ($TCID_{50}$/ml) |
|---|---|---|---|
| Ausgangsmaterial | 3.3 | 173.5 | 6.6 |
| Filtrat | 2.8 | 143.2 | < 0.1 |

Beispiel 12 :

**Bestimmung der Aktivität von Blutfaktoren aus einem Kryoüberstand nach Filtration**

Ein Kryoüberstand von humanem Plasma wurde mit einer hochtitrigen Poliovirus-Präparation gespiked und einer Tiefenfiltration mit einer Durchflußrate von 50 ml/min unterzogen. Die Aktivitäten von Faktor VII, Faktor IX, Antithrombin III (ATIII) und C1-Esterase-Inhibitor wurden vor und nach der Filtration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt und zeigen, daß durch das beschriebene Verfahren eine Virus-Abreicherung von > 7 log-Stufen erreicht wird und die Aktivität der Blutfaktoren unbeeinträchtigt ist.

**Tabelle 12:** Bestimmung der Faktor VII-, Faktor IX-, ATIII- und C1-Esterase-Inhibitor-Aktivität vor und nach Filtration

| | Virustiter ($TCID_{50}$/m) | Aktivität (I.E./ml) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | FVII | FIX | AT-III | C1-Inhibitor |
| vor Filtration | $10^{7.3}$ | 0.83 | 0.75 | 0.92 | 0.76 |
| nach Filtration | $< 10^{0.7}$ | 0.80 | 0.76 | 0.95 | 0.76 |

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Biologisches Material frei von bestimmten Pathogenen, dadurch gewonnen, daß ein in einem biologischen Material enthaltener Ligand oder Rezeptor mit einem Rezeptor oder Liganden eines bestimmten Pathogens reagiert, wodurch ein Ligand/Rezeptor-Komplex entsteht, und Abtrennen des Ligand/-Rezeptor-Komplexes durch ein Verfahren, das die teilweise oder vollständige Abtrennung des komplexierten Pathogens vom biologischen Material erlaubt.

2. Biologisches Material nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein biologisches Material mit mindestens einem Liganden oder Rezeptor, der mit einem Rezeptor oder Liganden des bestimmten Pathogens reagiert, versetzt wird.

3. Biologisches Material nach Anspruch 1 oder 2, dadurch erhältlich, daß als Ligand oder Rezeptor, der mit einem Liganden oder Rezeptor des Pathogens reagiert, ein Antikörper eingesetzt wird, und der Ligand oder Rezeptor des Pathogens ein Antigen ist, wodurch ein Antikörper/Antigen-Komplex als Ligand/Rezeptor-Komplex entsteht.

4. Biologisches Material nach Anspruch 1 bis 3, dadurch erhältlich, daß das Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch Penetrieren durchlässiger Filter erfolgt.

5. Biologisches Material nach Anspruch 1 bis 3, dadurch erhältlich, daß das Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch Sedimentation erfolgt.

6. Biologisches Material nach Anspruch 5, dadurch erhältlich, daß die Sedimentation des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch Dichte-Gradientenzentrifugation erfolgt.

7. Biologisches Material nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch erhältlich, daß zur Verbesserung der Abtrennung des Li-

durch ein Agglutinin, insbesondere ein Lektin, eine Komplement-Komponente, ein Conglutinin, ein Rheumafaktor oder ein nicht-toxisches, wasserlösliches, synthetisches Polymer, insbesondere Polyethylenglykol, erfolgt.

8. Biologisches Material nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sicher frei ist von viralen und molekularen Pathogenen sowie von Aggregaten oder Komplexen der Pathogene.

9. Biologisches Material nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das virale Pathogen ein HAV, HBV, HCV, HIV, HEV, HDV, HGV, CMV und/oder Parvovirus ist.

10. Biologisches Material nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es anti-HAV-, anti-HCV-, anti-HBV und/oder anti-Parvovirus spezifische Antikörper enthält.

11. Biologisches Material nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Plasmafraktion, eine Plasmaprotein-haltige Fraktion enthaltend Blutfaktoren wie etwa Faktor II, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein C, Protein S, vWF, ein Konzentrat enthaltend einen der genannten Blutfaktoren, eine Immunglobulin-haltige Plasmafraktion oder ein Überstand einer Hybridoma-Zellinie, ein Zellkulturüberstand von transformierten oder infizierten Säugerzellen oder ein Extrakt eines tierischen oder humanen Gewebes ist.

12. Verfahren zur Abreicherung von viralen und molekularen Pathogenen und Gewinnen von biologischem Material, das sicher pathogenfrei ist, dadurch gekennzeichnet, daß ein in einem biologischen Material enthaltener Rezeptor oder Ligand mit einem Rezeptor oder Liganden eines Pathogens reagiert, wodurch gegebenenfalls ein Ligand/Rezeptor-Komplex eines komplexierten Pathogens entsteht, und gegebenenfalls Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch ein Verfahren, das die teilweise oder vollständige Abtrennung des komplexierten Pathogens vom biologischen Material erlaubt und Gewinnen eines pathogenfreien biologischen

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein biologisches Material mit mindestens einem Liganden oder Rezeptor, der mit einem Rezeptor oder Liganden des bestimmten Pathogens reagiert, versetzt wird, wodurch gegebenenfalls ein Ligand/Rezeptor-Komplex entsteht.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand/Rezeptor-Komplex eine höhere Dichte oder höheren Sedimentationskoeffizienten aufweist als das freie Pathogen.

15. Verfahren nach Anspruch 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand/Rezeptor-Komplex eine höhere Aggregierung aufweist als das freie Pathogen.

16. Verfahren nach Anspruch 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch Penetrieren eines durchlässigen Filters erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand/Rezeptor-Komplex selektiv vom durchlässigen Filter zurückgehalten wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß als durchlässiger Filter ein Nanofilter eingesetzt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß als durchlässiger Filter ein Tiefenfilter eingesetzt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Abtrennen des Ligand/Rezeptor-Komplexes durch Sedimentation erfolgt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Sedimentation des Komplexes durch Dichte-Gradientenzentrifugation erfolgt.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand oder Rezeptor des Pathogens, ein

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß der mit dem Liganden oder Rezeptor des Pathogens reagierende Ligand oder Rezeptor ein Agglutinin, ein Antikörper, ein Fragment eines Antikörpers oder ein noch bindungsfähiger Teil eines Antikörpers ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand/Rezeptor-Komplex ein Antikörper/-Antigen-Komplex ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß durch Anwesenheit eines Agglutinationsmittels, insbesondere eines Lektins, wie etwa Concanavalin A, Ricin oder Phasin, oder von Komplement-Komponenten, von Conglutinin, von Rheumafaktor, einem nicht-toxischen, wasserlöslichen, synthetischen Polymer, wie etwa Polyethylenglykol, oder Albumin eine weitere Aggregierung des Komplexes erfolgt.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß durch die weitere Aggregation eine höhere Komplexdichte erreicht wird, wodurch der Komplex mit verbesserter Effizienz aus dem biologischen Material entfernt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß das virale oder molekulare Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Lipid-umhüllten Viren, der nicht Lipid-umhüllten Viren oder der Prionen.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Pathogen ein HAV, HBV, HCV, HIV, HEV, HDV, HGV, CMV, Parvovirus etc. ist.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Ligand ein Antikörper, erhalten aus einer Hyperimmunglobulin-Lösung oder einem Überstand einer Hybridoma-Zellinie, eingesetzt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß der

rungsverfahren unterzogen wird und der Antikörper gegebenenfalls angereichert und als Ligand eingesetzt wird.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein anti-ß-Amyloid-Antikörper ist.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper mit einem Prion reagiert und einen Komplex bildet.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein HAV-, HBV-, HCV-, HDV-, CMV-, HIV-, HGV-, HEV- oder Parvovirus-spezifischer Antikörper ist.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Material eine Plasmafraktion, eine Plasmaprotein-haltige Fraktion enthaltend Blutfaktoren wie etwa Faktor II, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein C, Protein S, vWF, ein Konzentrat enthaltend einen der genannten Blutfaktoren, eine Immunglobulin-haltige Plasmafraktion oder ein Überstand einer Hybridoma-Zellinie, ein Zellkulturüberstand von transformierten oder infizierten Säugerzellen oder ein Extrakt eines tierischen oder humanen Gewebes ist.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Material hochmolekulare Proteine mit einem Molekulargewicht >150 kD enthält.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Material den durchlässigen Filter frei passiert und der Ligand/Rezeptor-Komplex zurückgehalten wird.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene biologische Material auf die Anwesenheit eines Liganden, insbesondere eines Antikörpers, getestet wird.

38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß dem biologischen Material eine bekannte Menge eines bestimmten viralen oder molekularen Pathogens, der spezifische Liganden oder Rezeptoren für den Antikörper besitzt, zugesetzt wird, das biologische Material enthaltend den Antikörper/Pathogen-Komplex erneut über einen durchlässigen Filter gefiltert wird und die Restmenge an Pathogen im Filtrat bestimmt wird.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß ein virusentferntes biologisches Material gewonnen wird, das sicher frei ist von Zielviren, wobei ein Reduktionsfaktor von mindestens 7 log-Stufen erreicht wird.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß die vollständige Abtrennung des Pathogens aus dem biologischen Material durch Bestimmung der Abreicherungsrate, insbesondere durch die Bestimmung der Genom-Äquivalente des Pathogens, erfolgt.

41. Virusinaktivierte Immunglobulin-Lösung zur Verwendung als Ligand in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 40.

42. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 40 zur Herstellung eines biologischen Materials, das sicher frei von bestimmten Pathogenen sowie frei von Aggregaten oder Komplexen eines Pathogens ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/AT 97/00075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61L2/02 A61K35/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| P,X | WO 96 35437 A (IMMUNO AG ;EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH () 14 November 1996<br>see the whole document<br>--- | 1-42 |
| X | EP 0 110 407 A (USV PHARMA CORP) 13 June 1984<br>see claims; examples I-III<br>--- | 1-3 |
| X | WO 90 15992 A (SMITH WILLIAM I JR) 27 December 1990<br>see claims<br>--- | 1-3 |
| X | FR 2 263 781 A (RESEARCH CORP) 10 October 1975<br>see claims; examples 1-5<br>---<br>-/-- | 1-3 |

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 9 September 1997 | 17 -09- 1997 |
| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr nal Application No
PCT/AT 97/00075

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | EP 0 447 984 A (ABBOTT LAB) 25 September 1991<br>see claims; examples<br>--- | 1<br><br>1-42 |
| A | EP 0 679 405 A (ROTKREUZSTIFTUNG ZENTRALLABORA) 2 November 1995<br>cited in the application<br>see claims<br>--- | |
| A | EP 0 525 502 A (OCTAPHARMA AG) 3 February 1993<br>----- | |

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr nal Application No
PCT/AT 97/00075

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 9635437 A | 14-11-96 | CA 2191475 A | 14-11-96 |
| | | EP 0769954 A | 02-05-97 |
| | | NO 970050 A | 07-01-97 |
| EP 0110407 A | 13-06-84 | AU 561920 B | 21-05-87 |
| | | AU 2179583 A | 07-06-84 |
| | | CA 1207662 A | 15-07-86 |
| | | JP 59110627 A | 26-06-84 |
| WO 9015992 A | 27-12-90 | AU 5952090 A | 08-01-91 |
| | | DE 69016656 D | 16-03-95 |
| | | DE 69016656 T | 24-05-95 |
| | | EP 0477302 A | 01-04-92 |
| | | US 5342753 A | 30-08-94 |
| FR 2263781 A | 10-10-75 | US 3896218 A | 22-07-75 |
| | | CH 595104 A | 31-01-78 |
| | | DE 2335145 A | 24-01-74 |
| | | GB 1430461 A | 31-03-76 |
| | | JP 49062626 A | 18-06-74 |
| | | NL 7309699 A | 15-01-74 |
| EP 0447984 A | 25-09-91 | AU 640467 B | 26-08-93 |
| | | AU 7362491 A | 26-09-91 |
| | | CA 2038534 A | 21-09-91 |
| | | JP 5078257 A | 30-03-93 |
| | | JP 8005805 B | 24-01-96 |
| EP 0679405 A | 02-11-95 | AU 1764295 A | 02-11-95 |
| | | CA 2147797 A | 26-10-95 |
| | | JP 8040920 A | 13-02-96 |
| | | NZ 270987 A | 27-08-96 |
| EP 0525502 A | 03-02-93 | DE 4125625 A | 04-02-93 |
| | | AT 143812 T | 15-10-96 |
| | | DE 59207324 D | 14-11-96 |
| | | ES 2092604 T | 01-12-96 |
| | | JP 5202100 A | 10-08-93 |
| | | SK 236992 A | 05-01-95 |
| | | US 5648472 A | 15-07-97 |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr nales Aktenzeichen
PCT/AT 97/00075

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61L2/02 A61K35/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )
IPK 6 A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| P,X | WO 96 35437 A (IMMUNO AG ;EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH () 14.November 1996<br>siehe das ganze Dokument | 1-42 |
| X | EP 0 110 407 A (USV PHARMA CORP) 13.Juni 1984<br>siehe Ansprüche; Beispiele I-III | 1-3 |
| X | WO 90 15992 A (SMITH WILLIAM I JR) 27.Dezember 1990<br>siehe Ansprüche | 1-3 |
| X | FR 2 263 781 A (RESEARCH CORP) 10.Oktober 1975<br>siehe Ansprüche; Beispiele 1-5 | 1-3 |

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
|---|---|
| 9.September 1997 | 17 -09- 1997 |

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Bevollmächtigter Bediensteter

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/AT 97/00075

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| X | EP 0 447 984 A (ABBOTT LAB) 25.September 1991<br>siehe Ansprüche; Beispiele<br>--- | 1 |
| A | EP 0 679 405 A (ROTKREUZSTIFTUNG ZENTRALLABORA) 2.November 1995<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe Ansprüche<br>--- | 1-42 |
| A | EP 0 525 502 A (OCTAPHARMA AG) 3.Februar 1993<br>----- | |

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen
PCT/AT 97/00075

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|---|---|---|
| WO 9635437 A | 14-11-96 | CA 2191475 A | 14-11-96 |
| | | EP 0769954 A | 02-05-97 |
| | | NO 970050 A | 07-01-97 |
| EP 0110407 A | 13-06-84 | AU 561920 B | 21-05-87 |
| | | AU 2179583 A | 07-06-84 |
| | | CA 1207662 A | 15-07-86 |
| | | JP 59110627 A | 26-06-84 |
| WO 9015992 A | 27-12-90 | AU 5952090 A | 08-01-91 |
| | | DE 69016656 D | 16-03-95 |
| | | DE 69016656 T | 24-05-95 |
| | | EP 0477302 A | 01-04-92 |
| | | US 5342753 A | 30-08-94 |
| FR 2263781 A | 10-10-75 | US 3896218 A | 22-07-75 |
| | | CH 595104 A | 31-01-78 |
| | | DE 2335145 A | 24-01-74 |
| | | GB 1430461 A | 31-03-76 |
| | | JP 49062626 A | 18-06-74 |
| | | NL 7309699 A | 15-01-74 |
| EP 0447984 A | 25-09-91 | AU 640467 B | 26-08-93 |
| | | AU 7362491 A | 26-09-91 |
| | | CA 2038534 A | 21-09-91 |
| | | JP 5078257 A | 30-03-93 |
| | | JP 8005805 B | 24-01-96 |
| EP 0679405 A | 02-11-95 | AU 1764295 A | 02-11-95 |
| | | CA 2147797 A | 26-10-95 |
| | | JP 8040920 A | 13-02-96 |
| | | NZ 270987 A | 27-08-96 |
| EP 0525502 A | 03-02-93 | DE 4125625 A | 04-02-93 |
| | | AT 143812 T | 15-10-96 |
| | | DE 59207324 D | 14-11-96 |
| | | ES 2092604 T | 01-12-96 |
| | | JP 5202100 A | 10-08-93 |
| | | SK 236992 A | 05-01-95 |
| | | US 5648472 A | 15-07-97 |